



TITLE:

Synthesis and Evaluation of Nanoparticle-based Probes for Visualizing the Concentration and Fluctuation of Oxygen in Living Cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Umehara, Yui

CITATION:

Umehara, Yui. Synthesis and Evaluation of Nanoparticle-based Probes for Visualizing the Concentration and Fluctuation of Oxygen in Living Cells. 京都大学, 2020, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22460>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要旨は2020-06-01に公開

京都大学	博士（工学）	氏名	梅 原 由 衣
論文題目	Synthesis and Evaluation of Nanoparticle-based Probes for Visualizing the Concentration and Fluctuation of Oxygen in Living Cells （細胞内の酸素濃度および変動を可視化するナノ粒子プローブの合成と機能評価）		
（論文内容の要旨）			
<p>本論文では、腫瘍をはじめとする疾患部位の近傍に存在する低酸素領域の可視化、および細胞内酸素濃度の変動をリアルタイムで可視化することを目的とし、光音響イメージングおよびりん光発光イメージングに有効であり、新しい概念に基づいたナノ粒子プローブの開発、および新しい化学発光イメージングシステムの開発を行った。その結果、高選択的に低酸素細胞に集積し、光音響イメージング（Photoacoustic Imaging, PAI）に有効な 2-ニトロイミダゾール修飾金ナノロッドプローブ、およびメソ孔シリカナノ粒子（Mesoporous Silica Nanoparticles, MSN）の細孔内部に固定化したりん光発光性ルテニウム錯体プローブ（MSN-Ru）の創製に成功した。以上の様に、本論文は、酸素濃度の変動に鋭敏に応答して発光強度が変化する細胞内酸素濃度センサープローブの開発に関する結果をまとめたものであって、5 章からなっている。。</p> <p>第 1 章では、2-ニトロイミダゾール誘導体と蛍光色素とを修飾した金ナノロッドプローブを開発した。本プローブは、低酸素細胞に過剰発現しているニトロ基還元酵素を利用した低酸素細胞蓄積型 PA プローブとして有効であることを明らかにした。共焦点レーザー顕微鏡により、低酸素濃度（0.3% O₂）で培養した細胞への本プローブの取り込み量は、通常の酸素濃度（20% O₂）で培養した細胞への取り込み量に比べ、約 2 倍に増大していることを確認した。さらに、本プローブ（5 pmol）を担がんマウスに尾静脈投与し、<i>in vivo</i> PAI を行った結果、本プローブが高選択的に腫瘍細胞に蓄積したことを示す明瞭な PAI 画像が得られた。</p> <p>第 2 章では、細胞内小器官である核をターゲットとし、核内の酸素濃度の変動を可視化するため、りん光発光性ルテニウム錯体と細胞核染色剤である Hoechst とを複合化した新規 Ru-Hoechst プローブを設計・合成し、その機能評価を行った。ルテニウム錯体は、一般に水溶性が高く、そのままでは細胞膜や核膜を通過できないが、Hoechst と複合化した Ru-Hoechst プローブは、核まで送達可能であることを明らかにした。さらに、Ru-Hoechst プローブの最適化を行った結果、Hoechst 分子とルテニウム錯体とを繋ぐアルキルリンカーが 6 つのメチレン鎖である Ru-Hoechst プローブが、最も高い効率で細胞に取り込まれ、さらに核内に移行することを明らかにした。本 Ru-Hoechst プローブを用いる蛍光イメージングにより、ミトコンドリアの機能阻害による酸素濃度変動が速やかに核内に伝播し、核内の酸素濃度が変動することを明らかにした。</p> <p>第 3 章では、メソ孔シリカナノ粒子（MSN）である MCM-41 を用い、その細孔内部にりん光発光性ルテニウム錯体を固定化した新規 MSN-Ru プローブを設計・合成し、その機能評価を行った。まず、マレイミド基を有する 1,10-フェナントロリンが配位したルテニウム錯体を合成し、細孔内部のメルカプト基のマレイミド基への Michael 付加反応により MCM-41 の細孔に固定化した結果、細孔径が維持された粒径約 200 nm の新規 MSN-Ru プローブの合成に成功した。次に、異なる酸素濃度における MSN-Ru プローブの発光スペクトルを測定し、Stern-Volmer プロットから <i>K</i>_{sv} 値（2649 M</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	梅 原 由 衣
<p>1) を算出した。その結果、MSN-Ru プローブの K_{sv} 値は、ルテニウム錯体単独の K_{sv} 値と同程度であり、高い酸素濃度応答性を有することを明らかにした。さらに、細胞に取り込まれた MSN-Ru プローブは、高い酸素濃度応答性を示し、りん光発光強度の明確な増減が観測された。一方、ルテニウム錯体を細孔内部に固定化することにより、ルテニウム錯体の毒性が抑制できるとともに、光照射により MSN の細孔内部で発生する一重項酸素 (1O_2) が効率的に失活し、1O_2 による毒性を完全に抑制できることを明らかにした。これらの成果は、MSN-Ru プローブを用いることにより、生体内での酸素濃度の変動を実時間モニタリング可能であることを示している。実際、下肢結紮マウスに MSN-Ru プローブを局所投与し、<i>in vivo</i> 蛍光イメージングを行った結果、結紮による血流の阻害により急性に発生させた低酸素環境下、MSN-Ru プローブの発光強度が増大することを確認した。</p> <p>第4章では、第3章で述べた MSN-Ru プローブのさらなる生体適合性の向上、および粒子の形状による 1O_2 の漏出抑制、および毒性発現の機構解明を目的とし、検討を行った。まず、粒径が約 100 nm、50 nm の MCM-48 および MCM-41 型の MSN を合成し、りん発光性ルテニウム錯体をそれぞれの MSN の細孔内部に固定化した。続いて、それらの物性評価と <i>in vitro</i> での機能評価を行った結果、ナノ粒子表面をリン酸塩で修飾した pMSN-Ru が、高い水分散性を有し、従来の MSN-Ru よりも大きい K_{sv} 値を示すことを明らかにした。また、粒径約 50 nm の MSN では、光照射時に強い細胞毒性が観測されたのに対し、粒径約 100 nm の MCM-48、MCM-41 にルテニウム錯体を固定化したいずれの pMSN-Ru プローブも、全く細胞毒性を示さなかった。さらに、粒径約 100 nm の2種類の pMSN-Ru プローブについて、細胞内の酸素濃度を変化させ、マイクロプレートリーダー、および共焦点顕微鏡を用いて、細胞からの発光強度を観察した結果、いずれの pMSN-Ru プローブも高い酸素濃度応答性を有することを明らかにした。</p> <p>第5章では、第3章と第4章で検討した MSN-Ru プローブの光照射により発生する毒性の高い 1O_2 は、MSN の細孔内部で失活するという特長を活かし、細胞内での酸化反応場として MSN を利用した新規化学発光システムを構築した。すなわち、熱分解により 1O_2 を発生するナフタレンエンドパーオキシド (NEP) を細孔内部に修飾した MSN (MSN-NEP) プローブを合成し、本プローブとアダマンチル基を有するビニルフェノール類とを混合するだけで、効率的に1,2-ジオキセタンが生成し、化学発光が観測された。また、1O_2 が細孔内部で完全に失活するため、細胞毒性は全く観測されなかった。</p> <p>以上、本論文では、細胞内および生体内に存在する低酸素領域の可視化、および酸素濃度変動に応答した可視化に極めて有効な新規ナノ粒子プローブを設計・合成し、それぞれのプローブについて、酸素濃度応答性を中心とする機能評価を行い、ナノ粒子プローブの開発に関する重要な指針を得た。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、腫瘍をはじめとする疾患部位の近傍に存在する低酸素領域の可視化を目的とし、腫瘍低酸素領域の可視化、および細胞内酸素濃度変動をリアルタイムで可視化する新しい概念に基づくナノ粒子プローブの開発についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 表面プラズモン吸収により、強い光音響信号を発生する金ナノロッドの表面に、低酸素細胞に過剰発現しているニトロ基還元酵素により還元される 2-ニトロイミダゾール誘導体を修飾した光音響イメージング (PAI) プローブを開発した。この金ナノロッドプローブに蛍光色素を同時に修飾することにより、低酸素環境下で培養した細胞によるプローブの取り込み量が、通常酸素環境下で培養した細胞の約 2 倍に増大することを明らかにした。さらに、本プローブを担がんマウスに尾静脈投与した結果、高い選択性で腫瘍低酸素領域に蓄積していることを *in vivo* PAI により明らかにした。

2. 次に、酸素濃度に応答したりん光発光を示すルテニウム錯体に、細胞核染色試薬である Hoechst を複合化することにより、細胞核内の酸素濃度の可視化に有効な Ru-Hoechst プローブを開発した。Ru-Hoechst プローブを用いることにより、ミトコンドリアの機能阻害による酸素濃度変動が、速やかに核内に伝播することを明らかにした。

3. りん光発光性ルテニウム錯体を、メソ孔シリカナノ粒子 (MSN) の細孔内部に固定化することにより、ルテニウム錯体による毒性と光照射時に発生する一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) による毒性を完全に抑制した MSN-Ru プローブを開発した。機能評価の結果、MSN 表面をリン酸基で修飾した約 100 nm の粒径を持つ pMSN-Ru プローブが、最も高い水分散性を示すとともに、光照射により発生する $^1\text{O}_2$ に起因する細胞毒性が全く観測されない酸素濃度センサープローブであることを明らかにした。

4. 新しい化学発光システムとして、熱分解により $^1\text{O}_2$ を発生するナフタレンエンドパーオキシド (NEP) を MSN の細孔内部に固定化した MSN-NEP プローブを合成した。本プローブとアダマンチル基を有するビニルフェノール類とを混合するだけで、効率的に 1,2-ジオキセタンが生成し、化学発光が観測された。また、 $^1\text{O}_2$ が細孔内部で完全に失活するため、細胞毒性は全く観測されなかった。

以上の様に、本論文は、細胞内の酸素濃度および変動をリアルタイムで可視化するナノ粒子プローブの開発に関する重要な知見を与えるものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 2 年 2 月 17 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規定第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を公約したものとすることを認める。